

명세서

발명의 명칭: 에피갈로카테킨-3-갈레이트에 의해 불활화된 지카바이러스를 유효성분으로 포함하는 백신 조성물 기술분야

- [1] 본 발명은 에피갈로카테킨-3-갈레이트(Epigallocatechin-3-gallate; EGCG)에 의해 불활화된 지카바이러스를 유효성분으로 포함하는 백신 조성물에 관한 것이다.

배경기술

- [2] 다양한 불활화 백신 제조방법 중 하나인 포르말데하이드(formaldehyde) 불활화 방법은 지난 수십년 동안 A형 간염 바이러스, 호흡기세포융합 바이러스(respiratory syncytial virus; 이하 RSV라 함), 인플루엔자 바이러스, 일본뇌염 바이러스, 폴리오 바이러스, 홍역 바이러스, 광견병 바이러스 등 다양한 바이러스에 대한 상업용 백신 제조에 사용되어왔다. 그러나 포르말데하이드로 불활화한 RSV 및 폴리오 바이러스 백신의 경우, 포르말데하이드 처리에 의한 항원 변성 및 부분적인 파괴로 인하여, 백신의 효과가 낮아지는 역효과들이 보고되었다. 특히 RSV의 경우, 접종 이후 바이러스의 감염이 증가하는 것으로 나타났고, 포르말데하이드로 불활화한 RSV 백신의 바이러스 중화항체 형성이 낮은 것이 이러한 현상에 대한 원인 중 하나로 알려져 있다. 이처럼 약한 면역반응은 백신을 접종한 사람의 재감염 위험과 질병악화를 일으킬 수 있다.
- [3] 포르말데하이드 불활화 백신 접종 후 바이러스에 대한 낮은 중화항체 형성에 대한 원인은 포르말데하이드에 의한 백신 항원 단백질의 광범위한 수식화에 기인한다. 단백질을 구성하는 총 20개의 아미노산 중 라이신을 포함하는 총 15종 이상의 아미노산에 수식화를 야기하며 이는 백신효능을 저하하는 요인으로 작용한다. 특히 라이신에 작용하여 카르보닐기(carbonyl group) 함량을 증가시킴으로써, 면역원성에 영향을 줄 수 있다는 연구결과를 통해 유추할 수 있다. 현재 개발 중인 지카바이러스 백신들의 연구결과에서도 RSV 백신에 대한 연구결과와 유사한 사례들을 확인할 수 있는데 영장류와 인간 대상 시험에서 약독화 생백신은 높은 중화항체 역가(>1:1,000)를 이끌어낸 반면, 포르말데하이드로 불활화한 백신은 매우 낮은 중화항체 역가(>1:100)가 유도된 것을 확인할 수 있다. 다양한 백신 효과에 기여하는 항체면역 반응은 감염체를 직접 중화능을 가진 중화항체를 포함하는 체액성 면역이 우선적으로 중요하다. 이와는 별도로 항체는 대식세포 등을 바이러스에 감염된 세포에 유인하여 항체의존세포독성(ADCC)을 유발하여 방어기능을 유도할 수 있다. 이러한 방어기능은 항체의 isotype 유형에 따라 결정되는데 마우스 동물의 경우 주요 IgG 항체인 IgG1(Th2형 기능)과 IgG2a(Th1 기능) 중에서도 특히 Th1 기능이 두드러진 IgG2a가 중요역할을 한다. 기존 포르말데하이드로 불활화한 백신은 대부분 면역 증강을 위해 수산화알루미늄 겔으로 보강되어 있는바 이러한 Th1 기능이 매우 약함이 단점으로 지적된다. 따라서 이

를 극복하여 백신면역에 의해 중화기능 외에도 항체의존세포독성을 유발하는 Th1 기능강화가 유도되는 효과가 있는 백신개발이 숙제로 남아 있다. 특히 불활화 백신의 경우, 이러한 면역기능 강화를 위해 다양한 수산화알루미늄염 겔과는 차별화된 면역증강제를 조합하여 사용함이 일반적이다. 그러나 이는 고가의 면역증강제를 사용해야 하는 한계점으로 인해 상용화의 어려움으로 지적된다. 따라서 별도의 추가적인 불활화제 또는 면역증강제의 조합이 없이도 효과적인 불활화 지카백신의 개발은 한계로 남아있다.

[4] [선행기술문헌]

[5] [특허문헌]

[6] (특허문헌 0001) 1. 대한민국 공개특허 제10-2019-0127605호 (2019.11.13. 공개)

발명의 상세한 설명

기술적 과제

[7] 본 발명의 목적은 에피갈로카테킨-3-갈레이트(Epigallocatechin-3-gallate; EGCG)에 의해 불활화된 지카바이러스를 유효성분으로 포함하는 백신 조성물을 제공하는 것이다.

과제 해결 수단

[8] 상기 목적을 달성하기 위해, 본 발명은 에피갈로카테킨-3-갈레이트(Epigallocatechin-3-gallate; EGCG)에 의해 불활화된 지카바이러스를 유효성분으로 포함하는 백신 조성물을 제공한다.

발명의 효과

[9] 본 발명에 따르면, 에피갈로카테킨-3-갈레이트(Epigallocatechin-3-gallate; EGCG)로 불활화한 지카바이러스 백신이 기존에 알려진 바이러스 불활화물질인 포르말데하이드(formaldehyde)로 불활화한 지카바이러스 백신보다 중화항체에 의한 백신 효과가 더 우수할 뿐만 아니라, 항체에 의한 세포독성 면역 효능 또한 월등히 향상시키는 것을 확인함으로써, 별도의 불활화물질이나 면역증강제와의 조합이 없이도 EGCG 단일 물질을 지카바이러스 백신 조성물로서 유용하게 활용될 수 있다.

도면의 간단한 설명

[10] 도 1은 포르말데하이드 및 에피갈로카테킨 갈레이트의 지카바이러스에 대한 항바이러스 효과를 분석한 결과이다. 도1a 와 도1b는 0.1% FA 처리시 ZIKV에 대한 항바이러스 효과에 대한 것이고, 도1c, 도 1d 및 도1e는 각각 0.1% EGCG, 0.2% EGCG 및 0.5% EGCG 처리 시 ZIKV에 대한 항바이러스 효과에 대한 것이다.

[11] 도 2는 불활화한 지카바이러스 백신; 및 상기 백신과 면역증강제(수산화알루미늄염 겔)를 혼합한 혼합액의 독성을 분석한 결과이다.

[12] 도 3은 불활화한 지카바이러스 백신의 면역원성을 확인하기 위해, 백신을 마우스에 접종 후 얻은 혈청에서 IgG 항체가를 분석한 결과이다.

- [13] 도 4는 불활화한 지카바이러스 백신의 면역원성을 확인하기 위해, 백신을 마우스에 두 번째 접종 후 얻은 혈청에서 IgG 및 아형(IgG1 및 IgG2a) 항체를 분석한 결과이다. 도4a는 IgG 항체가 분석결과이며, 도4b는 IgG1에 대한 항체가 분석결과이고, 도4c는 IgG2a 항체가 분석결과이다.
- [14] 도 5는 지카바이러스 백신의 지카바이러스 E 단백질에 대한 항체 효과를 효소면역측정법으로 분석한 결과이다. 도5a는 IgG 항체 효과에 대한 분석결과이며, 도5b는 IgG1 항체 효과에 대한 분석결과이고, 도5c는 IgG2a 항체 효과에 대한 분석결과이다.
- [15] 도 6은 지카바이러스 E 단백질을 세포 내 엔도솜의 환경과 유사한 pH 5 상태를 만들어주어 단백질의 구조적 변화를 유도한 후, 효소면역측정법을 통해 면역원성을 분석한 결과이다. 도6a는 IgG 항체에 대한 분석결과이며, 도6b는 IgG1 항체에 대한 분석결과이고, 도6c는 IgG2a 항체에 대한 분석결과이다.
- [16] 도 7은 불활화한 지카바이러스 백신의 중화항체 효과를 분석한 결과이다.
- 발명의 실시를 위한 최선의 형태**
- [17] 이하, 본 발명을 보다 상세하게 설명한다.
- [18] 본 발명은 에피갈로카테킨-3-갈레이트(Epigallocatechin-3-gallate; EGCG)에 의해 불활화된 지카바이러스를 유효성분으로 포함하는 백신 조성물을 제공한다.
- [19] 상기 EGCG는 상기 지카바이러스 단백질에 결합할 수 있다.
- [20] 또한, 상기 EGCG는 상기 지카바이러스를 불활화하고, 세포독성 면역효능을 향상시킬 수 있다.
- [21] 상기 지카바이러스는 브라질 또는 보라카이에서 유래한 것일 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.
- [22] 상기 조성물은 EGCG를 0.1 내지 0.5%(w/v) 포함할 수 있다.
- [23] 또한, 상기 조성물은 EGCG를 중성 pH로 조절할 수 있는 용액에 녹인 것일 수 있고, 바람직하게는 0.2%(w/v)로 인산완충식염수에 녹인 것일 수 있다.
- [24] 또한, 상기 조성물은 면역증강제(adjuvant)를 추가로 포함할 수 있고, 상기 면역증강제는 수산화알루미늄겔(Aluminum Hydroxide Gel), 모노포스포릴지질 A(monophosphoryl lipid A), MF59, AS03, AF03, AS01, AS04, CpG ODN 및 바이로솜(virosome)으로 이루어진 군에서 선택된 하나 이상일 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.
- [25] 상기 MF59, AS03 및 AF03은 프로인드 보조제(freund's adjuvant)이고, 상기 AS01, AS04, CpG ODN 및 바이로솜(virosome)은 TLR(Toll-like receptor)보조제(adjuvant)이다.
- [26] 또한, 상기 조성물은 불활화된 지카바이러스 100 중량부에 대하여 면역증강제를 5 내지 20 중량부로 포함할 수 있다.
- [27] 본 명세서의 용어, "백신"은 대상(subject)의 면역 반응에 긍정적으로 영향을 주는 조성물을 의미하는 가장 광범위한 의미로 사용된다. 백신 조성물은 대상에게

세포성 면역 반응, 예를 들어 CTL(Cytotoxic T Lymphocyte) 또는 체액성 면역 반응, 예를 들어 항체에 의해 유발되는 향상된 전신적 또는 국소적 면역 반응을 제공한다.

- [28] 본 발명의 백신 조성물은 약제학적으로 허용되는 담체를 추가적으로 포함할 수 있다. 본 명세서의 용어 "약제학적 유효량"은 바이러스에 의해 유발되는 질병 또는 병리학적 증상에 대한 예방, 경감 또는 치료적 효능을 달성하는 데 충분한 양을 의미한다. 본 발명의 조성물에 포함될 수 있는 약제학적으로 허용되는 담체는 제제시에 통상적으로 이용되는 것으로서, 락토스, 덱스트로스, 수크로스, 솔비톨, 만니톨, 전분, 아카시아 고무, 인산 칼슘, 알기네이트, 젤라틴, 규산 칼슘, 미세 결정성 셀룰로스, 폴리비닐피롤리돈, 셀룰로스, 물, 시럽, 메틸 셀룰로스, 메틸히드록시벤조에이트, 프로필히드록시벤조에이트, 활석, 스테아르산 마그네슘 및 미네랄 오일 등을 포함하나, 이에 한정되는 것은 아니다. 본 발명의 조성물은 상기 성분들 이외에 윤활제, 습윤제, 감미제, 향미제, 유화제, 현탁제, 보존제 등을 추가로 포함할 수 있다. 본 발명인 백신 조성물은 기타 구성성분, 예컨대 안정화제, 부형제, 기타 약학적 허용 화합물 또는 임의의 기타 항원 또는 그의 일부를 포함할 수 있다. 백신은 냉동 건조된 제제 또는 현탁액의 형태로서 존재할 수 있으며, 이들은 모두 백신 생성 분야에 일반적인 것들이다.
- [29] 본 발명인 백신 조성물의 투여 형태는 장용피 사용 단위체의 형태, 복강내, 근육내 또는 피하 투여용 집종, 에어로졸 분무, 경구 또는 비강내 용도일 수 있다. 음용수 또는 식용 펠렛으로 투여하는 것도 가능하다. 본 발명의 백신 조성물은 이중 항원 및 시토킨과 같은 면역 조절 분자를 동일한 재조합체내에서 발현시켜 단일 백신으로 전달할 수도 있으며, 상이한 외래 유전자 또는 면역증강제를 보유하는 2 이상의 바이러스백터를 포함하는 "각테일"로서 투여할 수 있다.
- [30] 본 명세서의 용어, "면역증강제(adjuvant)"는 일반적으로 항원에 대한 체액 또는 세포 면역 반응을 증가시키는 임의의 물질(예컨대, alum, 프로인트완전 어주버트, 프로인트 불완전 어주버트, LPS, poly IC, poly AU 등)을 의미한다.
- [31] 이하, 본 발명의 이해를 돕기 위하여 실시예를 들어 상세하게 설명하기로 한다. 다만 하기의 실시예는 본 발명의 내용을 예시하는 것일 뿐 본 발명의 범위가 하기 실시예에 한정되는 것은 아니다. 본 발명의 실시예는 당업계에서 평균적인 지식을 가진 자에게 본 발명을 보다 완전하게 설명하기 위해 제공되는 것이다.
- [32] [실험예 1] 바이러스 및 동물세포 준비
- [33] 지카바이러스(Zika virus; 이하 ZIKV라 함)(Brazil, 16321, NCCP43245)는 질병관리본부 국립보건연구원 국가병원체자원은행으로부터 분양받아 사용하였다. 바이러스는 원숭이 신장세포에 접종하여 3일 동안 증식하였다. 증식시킨 바이러스의 배양물을 수확하고, 초저온 냉동고(-80°C)에 보관하였다. 원숭이 신장세포는 10% 소태혈청(이하 FBS라 함)을 첨가한 최소 필수 배지(MEM)로 구성된 영양배지 조건에서 배양하였고, 37°C 및 5% CO₂ 대기 조성 조건에서 배양하였다.
- [34] [실험예 2] 불활화 물질 제조

- [35] ZIKV백신을 위한 불활화 물질로 에피갈로카테킨 갈레이트(Epigallocatechin-3-gallate; 이하 EGCG라 함) 및 포름알데하이드(Formaldehyde; 이하 FA라 함)를 사용하였다. EGCG(순도 98%)는 Changsha Sunfull Biotech(창사, 중국)에서 구입하였다. FA는 Sigma-Aldrich(세인트루이스, 미국)에서 구입하였다. 상기 2종의 불활화 물질은 증류수(이하 DW라 함) 또는 인산완충식염수(이하 PBS라 함)에 녹였고, 0.2 μ m 주사기 필터로 정제하였다.
- [36] [실험예 3] ZIKV 백신 제조
- [37] ZIKV 백신을 제조하기 위해, 불활화 물질(EGCG 및 FA)로 ZIKV를 불활화(inactivation)하였다. 구체적으로, EGCG의 경우, EGCG를 DW 또는 PBS에 0.1, 0.2, 0.5 및 1%(w/v)로 녹인 후, EGCG 용액을 ZIKV와 섞어서 35°C에서 24시간 동안 보관하였다. 실험에는 ZIKV의 105, 106 및 107 PFU/ml 역가를 사용하였다. FA의 경우, 0.1%(v/v) FA를 동량의 ZIKV와 섞어주고, 35°C에서 24시간 동안 보관하였다.
- [38] [실험예 4] 플라크 역가 측정
- [39] 상기 실험예 3에서 제조한 ZIKV 백신을 검정하기 위해, 플라크 역가
- [40] 측정 방법을 수행하였다. 원숭이 신장세포를 FBS를 첨가한 최소 필수 배지(MEM)로 구성된 영양배지를 이용하여 6-웰 세포배양 플레이트에서 배양하였다. 세포가 배양된 플레이트는 PBS로 씻어내고, 10배씩 희석된 ZIKV 백신을 배양 플레이트의 웰마다 500 μ L씩 감염시켰다. ZIKV 백신을 감염시킨 플레이트는 37°C에서 2시간 동안 배양하였다. 그 후, 세포를 PBS로 씻어내어 접종물들을 제거하고, 2배 DMEM(Dulbecco's modified eagle medium) 및 2% 낮은 용점 아가로스(agarose)를 섞은 혼합액을 세포에 덮어씌웠다. 6-웰 플레이트는 37°C 및 5% CO₂ 대기 조성 조건에서 3일 동안 배양하였다. ZIKV 백신의 플라크가 형성된 후, 세포에 4% FA를 넣어 고정하였다. 그 후, 세포 위에 덮여 있던 혼합액을 제거하고, 시각화를 위해 크리스탈 바이올렛(Crystal violet)으로 염색하였다.
- [41] [실험예 5] ZIKV 백신의 독성 분석
- [42] 상기 ZIKV 백신의 독성을 확인하기 위해, 동물실험을 수행하였다. 5주령의 C57BL/6 암컷 마우스를 (주)오리엔트바이오로부터 구입하였다. 동물실험은 특정 무병원체 조건의 국제백신연구소에서 수행하였다. 모든 동물 실험은 국제백신연구소의 동물실험윤리위원회의 가이드라인에 따라 수행하였다. 일주일의 순응기간 후, 독성시험을 위해, DW 또는 PBS에 녹인 0.1% FA 또는 0.2% EGCG를 마우스(그룹 당 5마리)에 근육주사로 접종하고, 7일 동안 마우스의 몸무게를 측정하였다.
- [43] 그 후, 0.1% FA 또는 0.2% EGCG로 불활화한 4.5 $\times$ 10⁵ PFU 역가의 ZIKV 백신을 마우스(그룹당 5마리)에 근육주사로 접종하였다. ZIKV 백신은 2% 수산화알루미늄겔(면역증강제)과 9:1 비율로 혼합하였다. 상기 불활화 물질은 DW 또는 PBS로 희석하였다. 첫 번째 백신 접종 후 2주 뒤에 첫 번째 접종과 동일한 양의 백신을 마우스에 접종하였다. 2% 수산화알루미늄겔(면역증강제)을 혼합한 PBS를 음성

대조군으로 설정하였다. 혈액 샘플은 2주 간격으로 2회 채취하였다. 채취한 혈액 샘플은 4°C 및 10000RPM 조건에서 20분 동안 원심분리 하였다. 원심분리한 혈액에서 혈전을 제거한 후, 상층액 혈청은 -20°C 온도에 보관하였다.

- [44] [실험예 6] ZIKV E 단백질의 낮은 pH 전처리
- [45] 효소면역측정법 분석을 수행하기 전, ZIKV SPH2015 외피 단백질(Sino Biological)을 낮은 pH 조건으로 전처리하였다. E 단백질 및 pH 5.0의 초산나트륨(Sigma-Aldrich)을 1:1 비율로 혼합하고, 혼합액은 상온에서 30분 동안 보존하였다. 효소면역측정법을 위하여, pH 5.0으로 전처리된 E 단백질을 96-웰 Nunc면역 플레이트에 코팅하고 4°C에서 보관하였다.
- [46] [실험예 7] 효소면역측정법
- [47] ZIKV 및 ZIKV E 단백질에 특이적인 항체를 확인하기 위해, 효소면역측정법을 수행하였다. Nunc-면역 96-웰 플레이트에 ZIKV(105 PFU/well) 및 ZIKVSPH2015 외피 단백질(0.1µg/well)을 코팅하고 4°C에서 하룻밤 동안 보관하였다. 코팅된 플레이트는 소혈청 알부민[1%(v/v)]으로 1시간 동안 블로킹(blocking)하였다. 마우스 혈청들은 혈청 희석 완충액(tween 20 계면활성제가 첨가된 PBS에 0.25% 소혈청 알부민을 혼합한 용액)에 1:50 비율로 희석하였다. 코팅된 플레이트를 tween 20 계면활성제가 첨가된 PBS로 씻어낸 후, 2배 연속 희석시킨 혈청을 넣고, 상온에서 1시간 보존하였다. HRP(Horseradish peroxidase)-conjugated goat antimouse IgG-h+l, IgG1 또는 IgG2a 항체를 1:10000 비율로 희석하고, 혈청이 부착된 플레이트에 넣은 후, 상온에서 1시간 동안 보존하였다. 플레이트는 tween 20 계면활성제가 첨가된 PBS로 씻어낸 후, TMB(substrate)에 넣고 상온에서 30분 동안 보존하였다. 30분 후 발색반응을 중단시키기 위해, 2N 황산용액을 넣어주었다. 플레이트의 흡광도는 효소면역측정법 플레이트 측정기로 450nm에서 분석하였다.
- [48] [실험예 8] 플라크 감소 중화시험법
- [49] ZIKV에 대한 중화항체 역가를 측정하기 위해, 플라크 감소 중화시험법을 수행하였다. 원숭이 신장세포는 37°C에서 하룻밤 정도 6-웰 플레이트에 배양하였다. 마우스 혈청들은 최소 필수 배지(MEM)에 1:25 비율로 희석하고, 56°C에서 30분 동안 열 불활화하였다. 불활화한 마우스 혈청은 2배 연속 희석하고, 동일한 양의 ZIKV(5.0×10^3 PFU/ml)를 혼합한 후, 37°C에서 1시간 동안 보존하였다. 혼합물을 원숭이 신장세포를 배양한 플레이트에 넣고, 플라크 분석법을 수행하였다. 플레이트는 37°C 및 5% CO₂ 대기 조성 조건에서 2일 동안 배양하였다. 플라크 감소 중화시험법 50 역가는 음성대조군과 비교해서 플라크 수가 50% 감소하는 혈청 희석배수로 결정하였다. 국제백신연구소로부터 Anti-ZKA185 human IgG1 항체 및 면역된 C57BL/6 마우스 혈청을 얻었으며, 플라크 감소 중화시험법의 대조군으로 사용하였다.
- [50] [실시예 1] 불활화 물질의 pH 분석
- [51] 상기 실험예 2에서 제조한 2종의 불활화 물질(FA 및 EGCG)의 pH 값을 비교하였다. 그 결과, 표 1에 나타난 바와 같이, PBS보다 DW에 녹인 불활화 물질이 모든

농도에서 pH 값이 낮게 나타났고, 구체적으로 EGCG는 농도가 증가할수록 pH 값이 낮아지는 것을 확인하였다.

[52] [표1]

불활화 물질	용매	3%	2%	1%	0.2%	0.1%
FA	DW	-	-	-	-	4.87
	PBS	-	-	-	-	7.46
EGCG	DW	-	-	4.90	5.22	5.17
	PBS	-	-	6.93	7.27	7.39

[53] [실시에 2] 불활화 물질의 항바이러스 효과 분석

[54] 상기 실험예 2에서 제조한 불활화 물질의 ZIKV에 대한 항바이러스 효과를 분석하였다. 그 결과, 도 1에 나타난 바와 같이, 0.1% FA, 0.2% EGCG 및 0.5% EGCG 처리 시, 1×10^6 및 1×10^7 PFU/ml의 ZIKV가 완전히 불활화하였고, 0.1% EGCG 처리 시, 1×10^5 및 1×10^6 PFU/ml의 ZIKV가 완전히 불활화한 반면, 1×10^7 PFU/ml의 ZIKV는 대조군 대비 56배 불활화하는 것을 확인하였다.

[55] [실시에 3] ZIKV 백신의 독성 분석

[56] 상기 불활화 물질로 불활화한 ZIKV 백신의 독성을 확인하기 위해, 0.2% EGCG 또는 0.1% FA로 불활화한 ZIKV 백신을 마우스에 접종 후, 7일 동안의 몸무게 변화를 측정하였다. 그 결과, 도 2A에 나타난 바와 같이, 실험군간 유의미한 몸무게 변화는 나타나지 않는 것을 확인하였다. 또한, 상기 ZIKV 백신에 수산화알루미늄겔(면역증강제)을 첨가한 혼합액을 마우스에 접종 후, 7일 동안의 몸무게 변화를 측정하였다. 그 결과, 도 2B에 나타난 바와 같이, 실험군간 유의미한 몸무게 변화는 나타나지 않는 것을 확인하였다.

[57] [실시에 4] ZIKV 백신의 면역원성 분석

[58] ZIKV 백신의 면역원성을 확인하기 위해, 0.2% EGCG 또는 0.1% FA로 불활화한 ZIKV 백신(4.5×10^5 PFU/100 μ l); 또는 상기 ZIKV 백신과 수산화알루미늄겔(면역증강제)을 9:1 비율로 섞은 혼합액을 C57BL/6 마우스에 2주 간격으로 총 2회 접종(intramuscular injection; IM)하고, 2주 후 마우스에서 혈청을 얻은 후, 효소면역측정법으로 면역원성을 분석하였다. 실험군당 마우스는 5마리로 설정하였다. 그 결과, 도 3에 나타난 바와 같이, 0.2% EGCG로 불활화한 백신은 0.1% FA로 불활화한 백신보다 높은 IgG 항체가를 나타내는 것을 확인하였다.

[59] 또한, C57BL/6 마우스에 두 번째 백신 접종 후 얻은 혈청을 이용하여 ZIKV에 대한 IgG의 아형에 속하는 IgG1 및 IgG2a의 항체가를 확인하였다. 그 결과, 도 4에 나타난 바와 같이, IgG1 및 IgG2a 모두 FA보다 EGCG로 불활화한 백신이 더 높은 항체가를 나타냈고, PBS에 녹인 0.2% EGCG로 불활화한 백신이 가장 높은 IgG2a 아형 항체가를 나타내는 것을 확인하였다.

[60] [실시에 5] ZIKV E 단백질에 대한 항체 효과 분석

- [61] ZIKV E 단백질에 대한 항체 효과를 확인하기 위해, C57BL/6 마우스에 두 번째 백신 접종 후 얻은 혈청을 이용하여 효소면역측정법으로 IgG 및 아형의 항체가를 측정하였다. 그 결과, 도 5에 나타난 바와 같이, IgG의 경우, 0.2% EGCG로 불활화한 백신에서 가장 높은 항체가가 나타났고, 0.2% EGCG 또는 0.1% FA로 불활화한 백신은 DW보다 PBS에 녹인 것에서 더 높은 항체가가 나타나는 것을 확인하였다. 또한, IgG1의 경우, 0.2% EGCG로 불활화한 백신은 PBS보다 DW에서 녹인 것이 더 높은 IgG1 항체가가 나타나는 반면, 0.1% FA 불활화 백신은 DW보다 PBS에 녹인 것에서 더 높은 항체가가 나타나는 것을 확인하였다. 또한, IgG2a의 경우, PBS에 녹인 0.2% EGCG로 불활화한 백신이 가장 높은 항체가를 나타낸 반면, DW에 녹인 0.1% FA로 불활화한 백신은 항체가가 나타나지 않았고, PBS에 녹인 0.1% FA로 불활화한 백신은 0.2% EGCG로 불활화한 백신과 비교해서 낮은 항체가를 나타내는 것을 확인하였다.
- [62] 또한, ZIKV E 단백질에 초산나트륨을 처리하여 세포 내 엔도솜(endosome)의 환경과 유사한 pH 5 상태를 만들어주어 E 단백질의 구조적 변화를 유도한 후, 효소면역측정법을 이용하여 면역원성을 분석하였다. 그 결과, 도 6에 나타난 바와 같이, 전반적으로 ZIKV E 단백질에 초산나트륨을 처리하지 않은 결과와 비슷하게 나타나는 것을 확인하였다. 구체적으로, PBS에 녹인 0.2% EGCG로 불활화한 백신에서 IgG 및 IgG2a 항체가가 가장 높게 나타났고, 0.1% FA로 불활화한 백신은 DW보다 PBS에 녹인 것에서 IgG, IgG1 및 IgG2a 항체가가 더 높게 나타나는 것을 확인하였다.
- [63] [실시예 6] ZIKV 백신의 면역유도 효과 분석
- [64] ZIKV 백신의 Th1 및 Th2형 면역유도 효과를 확인하기 위해, 0.1% FA 또는 0.2% EGCG로 불활화한 백신을 접종한 C57BL/6 마우스로부터 얻은 항체를 이용하여 ZIKV, ZIKV E 단백질 및 pH 5로 전처리한 ZIKV E 단백질에 대한 항체 효과를 효소면역측정법으로 분석하였다. 그 결과, 표 2에 나타난 바와 같이, 항체가를 IgG2a/IgG1 비율로 계산했을 때, 0.1% FA보다 0.2% EGCG로 불활화한 백신의 IgG2a비율이 높게 나타나는 것을 확인하였다. 구체적으로, FA로 불활화한 백신 대비 EGCG로 불활화 백신의 항체의 역가 비율은 ZIKV에 대해서는 15배, ZIKV E 단백질 및 pH 5 전처리한 ZIKV E 단백질에 대해서는 500배 이상으로 나타났다. 상기 결과는 별도의 면역증강제 없이 나타난 효과를 확인한 것으로, 상기 결과로부터, EGCG는 단일 성분으로서 불활화 기능과 아울러 Th2 면역반응에서 Th1 면역반응으로 reprogram기능을 보유함으로써, ZIKV 백신의 효능을 크게 증가시키는 것을 확인하였다.
- [65] [표2]

	백신	IgG1	IgG2a	IgG2a/IgG1	Fold change of ratio of EGCGi/FAi
ZIKV	0.1% FA	25600	100	0.004	15
	0.2% EGCG	102400	6400	0.063	
ZIKV E 단백질	0.1% FA	3200	200	0.062	>500
	0.2% EGCG	1600	51200	32	
ZIKV E 단백질 (pH 5 전처리)	0.1% FA	1600	100	0.062	>500
	0.2% EGCG	800	25600	32	
EGCGi = EGCG로 불활화한 ZIKV 백신					
FAi = FA로 불활화한 ZIKV 백신					

[66] [실시예 7] ZIKV 백신의 중화항체 효과 분석

[67] ZIKV 백신의 중화항체 효과를 확인하기 위해, ZIKV 백신을 마우스에 두 번째 접종 후 얻은 혈청으로 플라크 감소 중화시험법을 이용하여 백신의 중화항체가를 측정하였다. 그 결과, 도 7에 나타난 바와 같이, 0.1% FA 및 1% EGCG로 불활화한 백신에서는 ZIKV에 대한 중화항체가가 거의 나타나지 않는 반면(검출한계 이하; 점선 표기), DW에 녹인 0.2% EGCG로 불활화한 백신의 경우, 중화항체가가 4~6배 증가하였고, PBS에 녹인 0.2% EGCG로 불활화한 백신의 경우, 중화항체가가 30배 이상 증가하는 것을 확인하였다. 상기 결과로부터, EGCG는 pH 중성 조건에서 DW로 녹일 때보다 PBS로 녹일 때 중화항체를 약 6배 증가시킬 수 있음을 확인하였다.

[68] 이상으로 본 발명 내용의 특정한 부분을 상세히 기술하였는 바, 당 업계의 통상의 지식을 가진 자에게 있어서, 이러한 구체적 기술은 단지 바람직한 실시양태일 뿐이며, 이에 의해 본 발명의 범위가 제한되는 것이 아닌 점은 명백하다. 즉, 본 발명의 실질적인 범위는 첨부된 청구항들과 그것들의 등가물에 의하여 정의된다.

청구범위

- [청구항 1] 에피갈로카테킨-3-갈레이트(Epigallocatechin-3-gallate; EGCG)에 의해 불활화된 지카바이러스를 유효성분으로 포함하는 백신 조성물.
- [청구항 2] 청구항 1에 있어서, 상기 지카바이러스는 브라질 또는 보라카이에서 유래한 것을 특징으로 하는 백신 조성물.
- [청구항 3] 청구항 1에 있어서, 상기 EGCG는 상기 지카바이러스를 불활화하고, 세포독성면역 효능을 향상시키는 것을 특징으로 하는 백신 조성물.
- [청구항 4] 청구항 1에 있어서, 상기 조성물은 EGCG를 0.1 내지 0.5%(w/v) 포함하는 것을 특징으로 하는 백신 조성물.
- [청구항 5] 청구항 1에 있어서, 상기 조성물은 EGCG를 중성 pH로 조절할 수 있는 용액에 녹인 것을 특징으로 하는 백신 조성물.
- [청구항 6] 청구항 5에 있어서, 상기 조성물은 EGCG를 0.2%(w/v)로 인산완충식염수(Phosphate-buffered saline; PBS)에 녹인 것을 특징으로 하는 백신 조성물.
- [청구항 7] 청구항 1에 있어서, 상기 조성물은 면역증강제(adjuvant)를 추가로 포함하는 것을 특징으로 하는 백신 조성물.
- [청구항 8] 청구항 7에 있어서, 상기 면역증강제는 수산화알루미늄 겔(Aluminum Hydroxide Gel), 모노포스포릴 지질 A(monophosphoryl lipid A), MF59, AS03, AF03, AS01, AS04, CpG ODN 및 바이로솜(virosome)으로 이루어진 군에서 선택된 하나 이상인 것을 특징으로 하는 백신 조성물.
- [청구항 9] 청구항 7에 있어서, 상기 조성물은 불활화된 지카바이러스 100 중량부에 대하여 면역증강제를 5 내지 20 중량부로 포함하는 것을 특징으로 하는 백신 조성물.